

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-143

(P2001-143A)

(43) 公開日 平成13年1月9日(2001.1.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 B 0 0 1
A 2 3 C 9/12		A 2 3 C 9/12	4 B 0 1 7
A 2 3 L 2/52		A 2 3 L 2/38	G 4 B 0 1 8
2/38		A 6 1 K 31/00	6 0 1 B 4 B 0 6 5
A 6 1 K 31/00	6 0 1		6 3 1 C 4 C 0 8 7
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-178377

(22) 出願日 平成11年6月24日(1999.6.24)

(71) 出願人 000006138

明治乳業株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(71) 出願人 000100492

わかもと製菓株式会社

東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号

(72) 発明者 木村 勝紀

東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳業
株式会社中央研究所内

(74) 代理人 100075775

弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Helicobacter pylori* 除菌性飲食品

(57) 【要約】

【解決手段】 *Helicobacter pylori* 除菌能の高い *Lactobacillus gasseri* (FERMP-17399) に属する乳酸菌を有効成分とする *H. pylori* の除菌性及び／又は感染防御性飲食品。

【効果】 該乳酸菌を用いて製造した酸乳等飲食品は、*H. pylori* の除菌性及び／又は感染防御性食品として長期間摂取するのに適している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Helicobacter pylori*除菌能の高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする*Helicobacter pylori*の除菌性及び／又は感染防御性飲食品。

【請求項2】 *Helicobacter pylori*除菌能が高く、低pH環境に耐性を有し、経口投与組成物とした際に生残性が高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする*Helicobacter pylori*の除菌性及び／又は感染防御性飲食品。

【請求項3】 乳酸菌が*Lactobacillus gasseri* OLL 2716であること、を特徴とする請求項1又は2に記載の飲食品。

【請求項4】 乳酸菌含有物が、乳酸菌懸濁液、乳酸菌培養物、乳酸菌培養液、乳酸菌発酵乳から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の飲食品。

【請求項5】 処理物が、濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物から選ばれる少なくともひとつ）、液状物、希釈物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の飲食品。

【請求項6】 飲食品が健康食品であること、を特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の飲食品。

【請求項7】 *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (FERM P-17399)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*：以下、*H. pylori*あるいはピロリ菌ということもある）の除菌及び／又は感染防御効果を有するラクトバチルス・ガッセリ（*Lactobacillus gasseri*：以下、*L. gasseri*ということもある）、ならびに、該乳酸菌を含有する飲食品に関する。

【0002】

【従来の技術】1983年にWarrenら（Lancet, 1, 1273 (1983)）によって胃内に棲息する細菌として*H. pylori*が発見されて以来、*H. pylori*と慢性胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍との関係につき注目されるようになった。最近では、スナネズミに*H. pylori*を感染させると発ガン物質の投与なしで胃腺ガンが発生する事実が認められており（Watanabe et al., Gastroenterology, 115; 642(1988)）、胃ガンの起因菌としても*H. pylori*との関連が指摘されている。

【0003】一方、*H. pylori*陽性の消化性潰瘍患者に対して*H. pylori*の除菌を行うと消化性潰瘍の再発が抑制されることが明らかになりつつあり、欧米では積極的な*H. pylori*の除菌療法が実施されている。*H. pylori*の除菌法

としては、抗生物質（ β -ラクタム剤系、アミノ配糖体系、マクロライド系、テトラサイクリン系等）と抗潰瘍剤を併用する方法が一般的であり、例えば、抗生物質2種（クラリスロマイシン-メトロニダゾールまたはアモキシシリン）と胃酸の分泌を抑制するプロトンポンプ阻害剤（PPI）を投与する3剤併用法が臨床的に実施されている。しかし、除菌治療を目的に抗生物質等の薬剤を投与することの最大の問題点は、薬剤耐性を有する*H. pylori*の出現頻度の増加と高用量の薬剤を多剤併用することによる下痢やアレルギー等の重篤な副作用の出現である。

【0004】そこで、抗生物質に代わる胃内*H. pylori*の除菌を目的に、ラクトフェリンを投与する方法（特開平10-130164）、*H. pylori*のウレアーゼ、鞭毛を抗原として鶏に免疫して得た特異抗原を用いる方法（特開平10-287585）、ならびに、乳酸菌を用いた方法として、*Lactobacillus brevis*および／又は*Lactobacillus salivarius*（特開平9-241173）、*Lactobacillus acidophilus*（特開平6-98782）それぞれの特定菌株の生菌を投与する方法につき検討がなされている。しかしながら、満足すべきものは未だ報告されていない。

【0005】一方、乳酸菌は好ましい香味物質を産生するとともに乳酸やバクテリオシン等の抗菌性物質産生能を有していることから、古来より発酵乳等を介して世界各地で食されてきた極めて安全性の高い微生物である。従って、乳酸菌の有する抗菌力を利用して*H. pylori*の除菌を行うことは、副作用を伴わずに手軽で有効な方法といえるのである。

【0006】しかし、既存の発明、特に*Lactobacillus brevis*および／又は*Lactobacillus salivarius*（特開平9-241173）については、乳酸菌株の選定に際して、*H. pylori*のターゲット部位である胃内環境（低pH下での環境に耐性を有する）という特性が考慮されていないのみならず、該乳酸菌株を使用した発酵乳等の食品としての特性（乳酸菌株の生残性、香味、物性）についても何ら考慮されていない。また、*Lactobacillus acidophilus*については、臨床試験に用いた結果、有効性が認められなかった旨報告されている（Bazzoli et al., Gastroenterology, 102, No.4, A38, (1992)）。一方、特開平6-98782号公報に開示された菌株*L. acidophilus* La1の培養上清を臨床試験に用いた結果、*H. pylori*の除菌の可能性は示唆されたものの、その持続効果については明らかにされていない。（Michetti et al., Gastroenterology, 108, No.4, A166, (1995)）。上記のように、既存の乳酸菌では、目的とする*H. pylori*除菌用組成物を調製するには未だ改良の余地が多く残されているのが現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、抗胃炎

や抗胃潰瘍等の面からも、ピロリ菌の除菌／感染防御システムの確立が希求されている当業界の現状に鑑み、安全性、経口摂取等の面から再度乳酸菌に着目し、乳酸菌を用いるピロリ菌の除菌／感染防御システムを新たに開発することとした。

【0008】すなわち、本発明が解決しようとする課題は、ピロリ菌の除菌および感染防御を目的に、胃内での生残性と定着性が高く、モデル動物試験において明らかに抗*H. pylori*活性を有しており、発酵乳等の食品に利用した際の特性（乳酸菌株の生残性、香味、物性）が高い乳酸菌株を選定し、該乳酸菌株を用いた安価で日常的摂取が可能な飲食品を新たに提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記した課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは、目的とする乳酸菌をスクリーニングするに際し、次のような基準を新たに設定し、鋭意選定作業を行った。すなわち、本発明者らは、ヒト腸内由来の数多くの乳酸桿菌のうち、①胃酸耐性が高い、②低pH条件下での生育が良好である、③*H. pylori*のヒト胃癌細胞MKN45付着抑制能が高い、④*H. pylori*と混合培養した際に*H. pylori*増殖阻害能が高い、⑤*H. pylori*感染モデルマウスに投与した際に*H. pylori*の除菌能が高い、⑥食品に適用した際に生残性が高く、香味、物性も優れている菌株の選定につき鋭意研究を重ねた結果、これらの条件に合致する菌株として*Lactobacillus gasseri* OLL 2716株（本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17399として寄託された。）を見出した。本菌株の菌学的性質は、以下のとおりである。

【0010】A. 形態的性状

細胞形態：桿菌

運動性：なし

孢子の有無：なし

グラム染色性：陽性

【0011】

B. 生理学的性状（陽性：＋、陰性：－、弱陽性：w）

カタラーゼ ー

ガス産生 ー

15℃での生育 ー

グルコン酸資化性 ー

乳酸旋光性 D L

好気性発育 ＋

【0012】C. 炭水化物発酵性（陽性：＋、陰性：－、弱陽性：w）

アラビノース ー

*キシロース	ー
ラムノース	ー
リボース	ー
グルコース	＋
マンノース	＋
フルクトース	＋
ガラクトース	＋
シュクロース	＋
セロビオース	＋
10 ラクトース	＋
トレハロース	＋
メリビオース	ー
ラフィノース	ー
メリチトース	ー
スターチ	w
マンニトール	ー
ソルビトール	ー
デキストリン	w

【0013】D. 遺伝学的特性

20 DNA中のグアニン（G）＋シトシン（C）含量は36.4％である。また、*L. gasseri* OLL 2716をTannockらの方法（Microbial. Ecol. Health Dis., 8:79-84, 1995; Appl. Environ. Microbiol., 62:4608-4613, (1996)）に準じて、培養後に菌体をアガロースプラグに固定し、溶解後、ゲノムDNAを制限酵素（Apa I）で分解して、パルスフィールドゲル電気泳動（CHEF-DR II BIO-RAD）を行ったところ、図1のバンドパターンを示した。図中、Aは*L. gasseri* OLL 2716株を示し、Bはサイズマーカーを示す。

30 【0014】E. 胃酸耐性

胃酸耐性試験は以下の通りに実施した。すなわち、ろ過滅菌したpH2.0の人工胃液〔0.2％NaCl、0.35％ペプシン（1：5000）を精製水で溶解〕9mlにMRS Broth(DIFCO)で2回賦活培養（37℃、18時間）し、生理食塩水で2回洗浄した*L. gasseri* OLL 2716株の菌体懸濁液1mlを添加し、好氣的に37℃で2時間接触後、1mlをpH6.5のリン酸緩衝液（67mM）9mlに添加し反応を停止させた。次に、初発菌数および人工胃液に接触後の菌数をMRS agarを用いて計測し、生残率を算出した。本法によりヒト腸内由来の乳酸桿菌（150株）のなかで最も高い胃酸耐性を示した*L. gasseri* OLL 2716株につき、他の菌株の胃酸耐性とを比較したところ、*L. gasseri* OLL 2716株の胃液耐性が最も高かった（表1）。

【0015】

（表1）各種乳酸桿菌の人工胃液耐性

菌 株	2時間処理後の生残率(%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> OLL 2716	0.53

5	6
Lactobacillus acidophilus JCM 1132T	0.48
Lactobacillus rhamnosus GG(ATCC 53103)	0.018
Lactobacillus salivarius WB1004(FERM P-15360)	0.004
Lactobacillus brevis WB 1005(FERM P-15361)	0.18

【0016】F. 低pH条件下での生育

MRS Brothで2回賦活培養(37℃、18時間)したL.gasseri OLL 2716株を変法MRS Broth〔0.2%NaCl、0.35%ペプシン(1:5000)をMRS Brothで溶解後、pH4.0に調整〕に10μl接種

*し、好氣的に37℃で培養した。培養9時間後に増殖度として培地の濁度(OD₆₅₀)を測定した。その結果、L.gasseri OLL 2716株は、低pH条件下において最も良好な生育を示した(表2)。

*10 【0017】

(表2) 低pH条件下での各種乳酸桿菌の生育

菌 株	9時間培養後のOD ₆₅₀
Lactobacillus gasseri OLL 2716	0.255
Lactobacillus acidophilus JCM 1132T	0.030
Lactobacillus rhamnosus GG(ATCC 53103)	0.222
Lactobacillus salivarius JCM 1231	0.116

【0018】G. ヒト胃癌細胞(MKN45)に対する付着能
L.gasseri OLL 2716株ならびにL.acidophilus CNCM I-1225のヒト胃癌細胞MKN45への付着能を、乳酸菌のヒト大腸癌細胞への付着能を調べたGranatoらの方法(Appl. Environ. Microbiol., 65(3)、1071-1077, (1999))に準じて検討した。MKN45を、10%FCSを含むRPMI1640培地(RPMI、日水製薬)10mlを用いて37℃で3日間培養した。培養後、細胞を剥がし、RPMIで洗浄後、細胞濃度が5×10⁴個/mlになるようにRPMIに懸濁させ、96穴マイクロプレートに1穴あたり0.1ml分注した。さらに37℃で3日間培養後、マイクロプレートに付着したMKN45を0.1Mリン酸緩衝液(pH6)で洗浄し、MKN45の単層を調製した。この単層※

20※にMRS broth(DIFCO)で培養後、10⁹CFU/mlとなるように0.1Mリン酸緩衝液(pH6)に懸濁したL.gasseri OLL 2716株もしくはL.acidophilus CNCM I-1224懸濁液0.1mlを加えて、37℃、30分間インキュベートした。MKN45の単層を0.1Mリン酸緩衝液(pH6)で3回洗浄して、付着しなかった乳酸菌を除去した後、グラム染色し、顕微鏡を用いて、MKN45に付着した乳酸菌数をカウントした。その結果、L.gasseri OLL 2716株のMKN45への付着菌数は、L.acidophilus CNCM I-1225より高いことを認めた。すなわち、L.gasseri OLL 2716株は、ヒト胃癌細胞に対して高い付着能を有することが確認された(表3)。

【0019】

(表3) Lactobacillus gasseri OLL2716株のヒト胃癌細胞に対する付着能

菌 株	MKN45細胞100個当りの付着菌数 (平均±標準偏差)
Lactobacillus gasseri OLL2716	560±55**
Lactobacillus acidophilus CNCM I-1225	234±30

**：p<0.01 (Student's t test, n=4)

【0020】L.gasseri OLL 2716株は、ヒト胃内環境において胃酸耐性が高く、かつ低pH条件下での生育が良好であり、該菌株の生菌を医薬品(抗胃炎剤、抗潰瘍剤)又は食品(発酵乳、液状、ペースト状、乾燥品)としてヒトに投与した際に、H.pyloriの除菌および宿主への感染を防御することによって胃炎または胃・十二指腸潰瘍の発症または再発を防止することが可能な菌株として選択したものである。そこで、L.gasseri OLL 2716株の抗H.pylori活性、ヨーグルトとしての製造特性(保存性、風味、物性)、ならびにH.pylori感染モデルマウス

★にL.gasseri OLL 2716株を投与した際のH.pyloriの除菌効果を、例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0021】すなわち本発明は、Helicobacter pylori(ピロリ菌)除菌能の高いLactobacillus gasseriに属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とするピロリ菌の除菌性及び/又は感染防御性食品に関するものである。

【0022】乳酸菌含有物としては、乳酸菌懸濁液；乳酸菌培養物(菌体、培養上清液、培地成分を含む)；乳

酸菌培養物から固形分を除去した乳酸菌培養液；乳酸菌飲料、酸乳、ヨーグルト等乳酸菌発酵した飲食品からなる乳酸菌発酵乳；等が挙げられる。

【0023】処理物としては、乳酸菌、乳酸菌含有物、発酵乳の濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等）、液状物、希釈物等が挙げられる。また、乳酸菌としては、生菌体、湿潤菌、乾燥菌等が適宜使用可能である。

【0024】本発明に係る飲食品は、乳酸菌、含有物、処理物の少なくともひとつを有効成分として含有してなるものであって健康食品としても有用である。

【0025】有効成分の飲食品への配合量は、任意でよいが、使用目的（予防、保健、又は治療）、に応じて適宜定めればよく、通常、0.0001～10%の範囲が適当である。しかしながら、長期間に亘って保健上ないし健康維持の目的で摂取する場合には、上記範囲よりも少量であってもよいし、また本有効成分は、安全性について問題がないので、上記範囲よりも多量に使用しても一向にさしつかえない。現にマウスを用いた10日間の急性毒性試験の結果、5000mg/kg/日の経口投与でも死亡例は認められなかった。

【0026】飲食品には、本有効成分をそのまま、使用したり、他の食品ないし食品成分と併用したりして適宜常法にしたがって使用できる。本有効成分を用いる本発明に係る組成物は、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状のいずれでもよいが、甘味料、酸味料、ビタミン剤その他ドリンク剤製造に常用される各種成分を用いて、健康ドリンクに製品化すると好適である。

【0027】本発明において、例えば、*L.gasseri* OLL 2716株の生菌をヨーグルト（プレーンヨーグルト、フルーツヨーグルト、デザートヨーグルト、ドリンクヨーグルト、フローズヨーグルト）を中心とした発酵乳、乳酸菌飲料、粉末食品、顆粒状食品、ペースト状食品等として摂取することが可能である。特に、*L.gasseri* OLL 2716株は、後述するように発酵乳を調製した際の製造特性（保存性、風味、物性）に優れており、発酵乳の形態で投与する方法が最も望ましい。発酵乳を調製する際のスターターは、*L.gasseri* OLL 2716株とともに、*Lactobacillus*属、*Streptococcus*属、*Leuconostoc*属、*Pediococcus*属等の乳酸菌や*Bifidobacterium longum*、*B.brev*e、*B.infantis*、*B.bifidum*等のビフィズス菌や酵母等を用いる方法が有効である。また、発酵乳調製用の*L.gasseri* OLL 2716株は、ストックカルチャーからマザースター、次にバルクスターをそれぞれ順次に調製する方法とマザースターの調製工程を経ずに直接バルクスター用もしくは製品製造用に接種する高菌数の濃縮スターター（凍結品又は凍結乾燥品）の利用が可能である。

【0028】

【試験例1】*L.gasseri* OLL 2716株による*H.pylori* NCTC 11637株のヒト胃癌細胞（MKN45）付着抑制を、Kabirらの方法（Gut, 41(1): 49-55, (1997)）に準じて実施した。

【0029】はじめに、*H. pylori* NCTC11637株の蛍光標識菌液を調製するために、微好気条件下で、5% FCS (Fetal Calf Serum) を含むBrucella broth (DIFCO) を用い、2回賦活培養（37℃、72時間）した*H. pylori* NCTC 11637株をPBSで洗浄後、細胞蛍光標識キットPKH-2（大日本製薬）のDiluent AにOD₆₅₀が2.0となるように懸濁した。微好気培養は、*Helicobacter*培養用ガス発生袋アネロバック・ヘリコ（三菱ガス化学）を用いて実施した。この懸濁液1mlに蛍光標識色素PKH-2を50μl添加し、室温で15分間反応させた後、遠心分離（3000rpm、10min）によって菌体を回収し、ハンクス平衡塩溶液（HGS）で洗浄後、HGS 1mlに懸濁し、蛍光標識菌液とした。次に、MKN45の細胞浮遊液（1×10⁶ cells/ml）0.8mlに*H. pylori* NCTC11637株の蛍光標識菌液（OD₆₅₀=2.0）0.1mlおよび*L.gasseri* OLL2716株の菌液（OD₆₅₀=4.0）0.1mlを同時に添加し、37℃で好氣的に1時間振とうした。ブランクにはMKN45の細胞浮遊液を単独で（MKN45細胞浮遊液0.8ml+HGS0.2ml）、陰性対照には*L.gasseri* OLL 2716株の菌液の代わりにHGSを添加したものをを用いた。振とう後、15% sucroseを含むDulbeccoのPBS（組織培養の技術（第6刷）、朝倉書店、pp20（1991））を9ml添加し、遠心分離（1000rpm、10min）によって細胞を回収し、HGSで遠心洗浄（1000rpm、10min）後、再度HGS 1mlに懸濁し、96穴の蛍光測定用マイクロプレートのウェルに懸濁液を250μl添加し、蛍光プレートリーダーで蛍光強度（励起波長：490nm、測定波長：530nm）を測定した。

【0030】その結果、*H. pylori* NCTC 11637株単独での胃癌細胞への付着率を100%としたとき、*L.gasseri* OLL 2716株を添加した系での*H. pylori* NCTC 11637株の付着率は、92.8%となり、本菌株が*H. pylori*の胃癌細胞への付着抑制効果を有することが確認された。

【0031】

【試験例2】*L.gasseri* OLL 2716株による*H. pylori* NCTC 11637株の増殖抑制試験として、5% FCSを含むBrucella broth (DIFCO) 200mlに2回賦活培養した*H. pylori* NCTC 11637株および*L. gasseri* OLL 2716株をそれぞれ10⁶ colony forming units (CFU)/mlおよび10⁵ CFU/mlとなるように接種し、37℃、微好気条件下で培養した。培養開始0、24、48時間後の*H. pylori* NCTC 11637株および*L.gasseri* OLL 2716株の生菌数を計測した。*H. pylori* NCTC 11637株および*L.gasseri* OLL 2716株の検出にはそれぞれ変法Skir

9

10

row培地 (Horse Blood (7%)、BHI agar (52g)、Trimethoprim (5mg/l)、Polymyxin B (2500 U/ml)、Vancomycin (10mg/l)、Bacitracin (5mg/l)、精製水 (1000ml) (37℃、7日間、微好気培養) およびMRS agar (37℃、48時間、嫌気培養) を用いた。

*では培養48時間後に生菌数が約5倍に増殖したのに対し、L. gasseri OLL 2716株が共存すると、H. pylori NCTC11637株の菌数が10分の1程度に減少し、L. gasseri OLL 2716株はH. pylori NCTC 11637株の増殖抑制能を有することが確認された(表4)。

【0033】

【0032】その結果、H. pylori NCTC 11637株の単独*

(表4) Lactobacillus gasseri OLL 2716株によるHelicobacter pylori NCTC 11637株の増殖抑制効果

菌 株	0h	24h	48h
Helicobacter pylori NCTC 11637	1.5×10^6	3.3×10^8	7.9×10^8
Helicobacter pylori 増殖率(%)	100	220.0	526.7
Lactobacillus gasseri OLL 2716	2.2×10^5	7.4×10^7	4.5×10^7
Helicobacter pylori NCTC 11637	1.9×10^6	1.2×10^6	1.8×10^5
Helicobacter pylori 増殖率(%)	100	63.2	9.5

【0034】

【試験例3】H. pyloriは尿素を分解してアンモニア産生能を有することから強い酸性条件下でも生残し得ることが明らかとなっている。そこで、尿素存在下でのL. gasseri OLL 2716株によるH. pylori NCTC 11637株の増殖抑制能を調べるため、低pH条件下での本菌株ならびにLactobacillus acidophilus CNCM I-1225のH. pylori NCTC 11637株に対する増殖抑制効果について検討した。5% FCSおよび5mM尿素を含むBrucella broth (pH4.0) 200mlに2回賦活培養したH. pylori NCTC 11637株およびL. gasseri OLL 2716株もしくはL. acidophilus CNCM I-1225株をそれぞれ 1.0^5 CFU/mlおよび 1.0^7 CFU/mlとなるように接種し、3 ※

20※7℃、微好気条件下で培養した。培養開始0、6、12時間後のH. pylori NCTC 11637株、L. gasseri OLL 2716株、L. acidophilus CNCM I-1225株それぞれの生菌数を測定した。

【0035】その結果、培養6時間と培養12時間後において、尿素存在下でのL. gasseri OLL 2716のH. pylori NCTC 11637に対する増殖抑制能は、L. acidophilus CNCM I-1225株よりも高いことを認めた。すなわち、L. gasseri OLL 2716株は、尿素存在下においてもH. pylori に対して高い増殖抑制能を有することが確認された(表5)。

【0036】

(表5) 尿素存在下でのLactobacillus gasseri OLL 2716によるHelicobacter pyloriの増殖抑制効果

菌 株	0h	6h	12h
Helicobacter pylori NCTC 11637	2.0×10^5	2.0×10^5	1.8×10^5
Helicobacter pylori 増殖率(%)	100	100	90.0
Lactobacillus gasseri OLL 2716	1.5×10^7	4.0×10^7	1.2×10^8
Helicobacter pylori NCTC 11637	2.0×10^5	1.5×10^5	3.0×10^4
Helicobacter pylori 増殖率(%)	100	75.0	15.0
Lactobacillus acidophilus CNCM I-1225	1.6×10^7	2.5×10^7	8.9×10^7
Helicobacter pylori NCTC 11637	2.0×10^5	1.9×10^5	1.0×10^5
Helicobacter pylori 増殖率(%)	100	95.0	50.0

【0037】

★50★【実施例1】L. gasseri OLL 2716株を用いてブレーン

ヨーグルトの調製を行った。すなわち、*L. gasseri* OLL 2716株、*L. bulgaricus* JCM 1002T、*S. thermophilus* ATCC19258をそれぞれ10%脱脂粉乳培地に1%宛て接種し、37℃で15時間培養してバルクスターを調製した。95℃で5分間加熱処理したヨーグルトミックス(SNF:9.5%、FAT:3.0%)に、*L. bulgaricus* JCM 1002T及び*S. thermophilus* ATCC 19258のスターを各1%、*L. gasseri* OLL 2716株のスターを5%接種して、43℃で4時間発酵させた。発酵・冷却直後の*L. gasseri* OLL 2716、*L. bulgaricus* JCM 1002T、*S. thermophilus* ATCC 19258それぞれの生菌数は 9.0×10^7 CFU/ml、 6.4×10^7 CFU/ml、 11.0×10^8 CFU/mlであり、風味、物性はどれも良好であった。また、このヨーグルトを10℃で2週間保存した際の*L. gasseri* OLL 2716、*L. bulgaricus* JCM1002T、*S. thermophilus* ATCC 19258それぞれの生菌数は、 3.7×10^7 CFU/ml、 2.7×10^7 CFU/ml、 10.8×10^8 CFU/mlであり、*L. gasseri* OLL 2716株の生菌数の低下は僅かであった。保存品の風味、物性も良好であった。

* 20

実施例1、比較例1をまとめると下表のようになる。

	保存	生菌数 ($\times 10^7$ CFU/ml)	酸度	pH	風味
	OLL 2716	WB 1004	(%)		
実施例1	保存前	9.0	0.90	4.42	良好
	2週間	3.7	1.11	4.07	良
比較例1	保存前	5.3	0.87	4.40	良好
	2週間	0.1	1.20	3.99	酸味が強い

【0040】

【試験例4】*L. gasseri* OLL 2716株、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)の生菌投与による*H. pylori*の除菌効果をin vivo系で調べる目的で、無菌マウス(BALB/c)1個体当たり*H. pylori* NCTC 11637株を 1×10^9 CFU感染させて4週間経過した*H. pylori*感染モデルマウスに、*L. gasseri* OLL 2716株、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株それぞれを 1×10^9 CFU/1個体を1週目に3回、2週目から7週目までは各週に1回それぞれ投与した。*L. gasseri* OLL 2716株又は*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株の生菌投与8週間後に、マウス胃内の*H. pylori*数、*L. gasseri* OLL 2716株数又は*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株数をそれぞれ変法Skirrow培地、MR Sagarで計測するとともに、酵素免疫測定法(ELISA)にて血清中の抗*H. pylori*抗体価(492 nmにおける吸光度)を調べた。

※

* 【0038】

【比較例1】*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株を用いてプレーンヨーグルトの調製を行った。すなわち、*L. gasseri* OLL 2716株の代わりに、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株を用いた以外は上記実施例1と同様の操作を行った。発酵・冷却直後の*L. salivarius* WB 1004、*L. bulgaricus* JCM 1002T、*S. thermophilus* ATCC 19258それぞれの生菌数は、 5.3×10^7 CFU/ml、 6.0×10^7 CFU/ml、 12.5×10^8 CFU/mlであり、風味、物性はいずれも良好であった。また、このヨーグルトを10℃で2週間保存した際の*L. salivarius* WB 1004、*L. bulgaricus* JCM 1002T、*S. thermophilus* ATCC19258それぞれの生菌数は、 0.1×10^7 CFU/ml、 4.5×10^7 CFU/ml、 8.8×10^8 CFU/mlであり、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株の生菌数は約1/50に低下した。保存品の風味は、酸味がやや強かった。

【0039】

※ 【0041】その結果、対照マウス(*H. pylori*のみを投与)の胃内*H. pylori*数が8週間後に 10^5 CFU/g以上検出されたのに対し、*L. gasseri* OLL 2716株、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株それぞれを生菌投与したマウスは、*H. pylori*数は検出限界値以下(10^3 CFU/g以下)に減少した。しかし、*L. gasseri* OLL 2716株投与マウスの抗*H. pylori*抗体価は対照マウスに比較して1/5以下に低下し、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株の抗*H. pylori*抗体価に比較しても1/4以下であった。(表6)。従って、*L. gasseri* OLL 2716株による*H. pylori*の除菌効果は、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360)株に比較して高いことを認めた。一方、*L. gasseri* OLL 2716株の投与8週目のマウスの胃内から投与した*L. gasseri* OLL 2716が 10^6 /g以上検出されたことから、本菌株は胃内定着能を有することを確めた。

※ 【0042】

(表6) 乳酸桿菌の胃内定着数と*Helicobacter pylori* NCTC 11637の除菌効果

マウス	胃内容物中の菌数(Log CFU/g)	抗 <i>H. pylori</i>
-----	---------------------	--------------------

13

14

ori抗体価
A492

L.salivarius L. gasseri H. pylori

対照(N=5、 乳酸菌無投与)	検出せず	検出せず	5.2±0.04	0.488±0.284 [†]
Lactobacillus gasseri OLL 2716 投与(N=6)	検出せず	6.1±1.0	<3.0	0.086±0.082 [†]
Lactobacillus salivarius WB 1004 (FERM P-15360) 投与(N=5)	6.1±0.8	検出せず	<3.0	0.346±0.276

*: P<0.05 (Scheffe test)

【0043】

【参考例1】L. gasseri OLL 2716株をMRS液体培地（Difco社製）5Lに接種後、37℃、18時間静置培養を行った。培養終了後、7,000rpm、15分間遠心分離を行い、培養液の1/50量の濃縮菌体を得た。次いで、この濃縮菌体を脱脂粉乳10%（重量）、グルタミン酸ソーダ1%（重量）を含む分散媒と同量混合し、pH7に調整後、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を60メッシュのフルイで粉体化し、凍結乾燥菌末を得た。

【0044】

【参考例2】第13改正日本薬局方解説書製剤総則「散剤」の規定に準拠し、上記実施例で得られたL. gasseri OLL 2716株の凍結乾燥菌末1gにラクトース（日局）400g、バレイショデンプン（日局）600gを加えて均一に混合し、散剤を製造した。

【0045】

【実施例2】脱脂乳を80～85℃で20～30分間殺菌した後、ホモゲナイズし、冷却した。これにスターターとして本菌株（FERM P-17399）の純培養物を2～5%加え、37～40℃で16時間発酵させ、乳酸含量2%の酸乳（脱脂乳培地における培養物）を得た。ついで、生じたカードを砕きながら、5℃に冷却し、これを酸乳とした。別に、しょ糖15%のほかに適量の酸味料、香料、色素を含有する糖液を調合し、ホモジナイズし、70～80℃で20～30分間殺菌した後、5℃に冷却し、糖液とした。このようにして得た酸乳35に対して糖液65の割合で混合して酸乳飲料を得た。

【0046】

【実施例3】ビタミンC40gまたはビタミンCとクエ*

*ン酸の等量混合物40g、グラニュー糖100g、コーンスターチと乳糖の等量混合物60gに、上記実施例1で得た本菌株の脱脂乳培地における培養物の凍結乾燥物を40g加えて十分に混合した。混合物を袋に詰め、1袋1.5gのステック状栄養健康食品を150袋製造した。

【0047】

【参考例3】次の配合により抗潰瘍剤を製造した。

（1）本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物50g、（2）ラクトース90g、（3）コーンスターチ29g、（4）ステアリン酸マグネシウム1g。先ず、（1）、（2）、（3）（但し17g）を混合し、（3）（但し7g）から調製したペーストとともに顆粒化した。得られた顆粒に（3）（但し5g）と（4）を加えてよく混合し、この混合物を圧縮錠剤機により圧縮して、1錠あたり有効成分を40mg含有する錠剤100個を製造した。

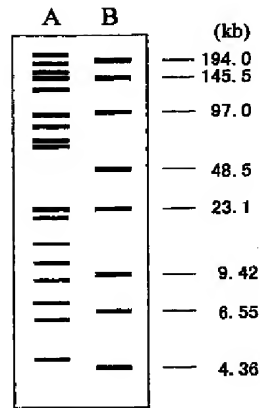
【0048】

【発明の効果】本発明によれば、ピロリ菌の除菌及び／又は感染防御が副作用を伴うことなく効率的に実施できる。本発明に係る組成物は、安全性には全く問題はなく、乳製品その他各種飲食品の形態に自由に調製することができるので、健常者はもとより、乳幼児、高齢者、病弱者、病後の人等も長期間に亘って摂取することができ、胃炎や胃潰瘍等に特にすぐれた予防及び／又は治療効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】Lactobacillus gasseri OLL 2716ゲノムのDNAのApa I分解パターン（パルスフィールド電気泳動）を示す。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成11年10月21日(1999.10.21)

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【手続補正1】

【補正内容】

【補正対象書類名】明細書

【0033】

(表4) *Lactobacillus gasseri* OLL 2716株による*Helicobacter pylori* NCTC 11637株の増殖抑制効果

菌 株	0h	24h	48h
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637	1.5×10^6	3.3×10^6	7.9×10^6
<i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%)	100	220.0	526.7
<i>Lactobacillus gasseri</i> OLL 2716	2.2×10^5	7.4×10^7	4.5×10^7
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637	1.9×10^6	1.2×10^6	1.8×10^6
<i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%)	100	63.2	9.5

【手続補正書】

【提出日】平成12年1月26日(2000.1.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Helicobacter pylori*除菌能の高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする*Helicobacter pylori*の除菌性及び／又は感染

防御性飲食品。

【請求項2】 *Helicobacter pylori*除菌能が高く、低pH環境に耐性を有し、経口投与組成物とした際に生残性が高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする*Helicobacter pylori*の除菌性及び／又は感染防御性飲食品。

【請求項3】 乳酸菌が*Lactobacillus gasseri* OLL 2716であること、を特徴とする請求項1又は2に記載の飲食品。

【請求項4】 乳酸菌含有物が、乳酸菌懸濁液、乳酸菌培養物、乳酸菌培養液、乳酸菌発酵乳から選ばれる少な

くともひとつであること、を特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の飲食品。

【請求項5】 処理物が、濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物から選ばれる少なくともひとつ）、液状物、希釈物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の飲食品。

【請求項6】 飲食品が健康食品であること、を特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の飲食品。

【請求項7】 *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (FERM BP-6999)。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記した課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは、目的とする乳酸菌をスクリーニングするに際し、次のような基準を新たに設定し、鋭意選定作業を行った。

すなわち、本発明者らは、ヒト腸内由来の数多くの乳酸桿菌のうち、①胃酸耐性が高い、②低pH条件下での生育が良好である、③*H. pylori*のヒト胃癌細胞MKN45付着抑制能が高い、④*H. pylori*と混合培養した際に*H. pylori*増殖阻害能が高い、⑤*H. pylori*感染モデルマウスに投与した際に*H. pylori*の除菌能が高い、⑥食品に適用した際に生残性が高く、香味、物性も優れている菌株の選定につき鋭意研究を重ねた結果、これらの条件に合致する菌株として*Lactobacillus gasseri* OLL 2716株（本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6999として寄託されている。）を見出した。本菌株の菌学

【書類名】 受託番号変更届

【提出日】 平成12年1月26日（2000. 1. 26）

【旧寄託機関の名称】通商産業省工業技術院
生命工学工業技術研究所

【旧受託番号】 FERM P-17399

【新寄託機関の名称】通商産業省工業技術院
生命工学工業技術研究所

【新受託番号】 FERM BP-6999

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターム(参考)
A 6 1 K 31/00	6 3 1	A 6 1 K 35/74	A
		C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 N 1/20			E
//(C 1 2 N 1/20		A 2 3 L 2/00	F
C 1 2 R 1:225)			
(72)発明者 金子 勉		F ターム(参考)	4B001 AC31 BC14 EC05 EC99
東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳業			4B017 LC03 LE05 LK18 LK25 LP05
株式会社中央研究所内			4B018 LB07 LE03 LE04 LE05 MD71
(72)発明者 平田 晴久			MD86 ME08 ME09 MF13
神奈川県足柄上郡大井町金手378番地 わ			4B065 AA01X AA30X AC05 AC20
かもと製薬株式会社相模研究所内			BB24 CA42 CA44
(72)発明者 古賀 泰裕			4C087 AA01 BC56 CA09 CA10 MA01
神奈川県伊勢原市望星台 東海大学医学部			MA16 MA23 MA28 MA43 MA44
内			MA52 NA14 ZA68 ZB35 ZC21